LUTTE BIOLOGIQUE CONTRE *DRECHSLERA TERES*: ACTION *IN VITRO* DE MICROORGANISMES ANTAGONISTES SUR LA CROISSANCE MYCÉLIENNE ET LA GERMINATION

M. MOSTAFA, G. BARRAULT et L. ALBERTINI

Laboratoire d'Ingénierie Agronomique, Ecole Nationale
Supérieure Agronomique, 145 avenue de Muret,
31075 Toulouse Cedex, France.

RÉSUMÉ - Cette étude a trait à l'activité antagoniste de microorganismes fongiques et bactériens sur les deux séquences biologiques majeures de *Drechslera teres* (croissance et sporulation). Les antagonistes les plus efficients sur la croissance mycélienne du pathogène appartiennent au genre *Trichoderma*. L'inhibition de la morphogenèse mycélienne est fonction de la température et du pH. Les actinomycètes ainsi que *Myrothecium verrucaria* exercent une activité antagoniste remarquable sur la germination conidienne liée à l'émission de substances antibiotiques télétoxiques.

ABSTRACT - These investigations showed the antagonistic action of fungal and bacterial microorganisms on the two major biological sequences of *Drechslera teres*. The antagonists that were the most efficient on mycelial growth belong to the genus *Trichoderma*. The inhibition of mycelial morphogenesis was temperature and pH dependent. The outstanding efficiency of antagonistic actinomycetes as well as of *Myrothecium verrucaria* on conidial germination was related to the release of teletoxic antibiotic substances.

MOTS CLÉS : Lutte biologique, antagonisme, *Drechslera teres*, *Hordeum vulgare*.

INTRODUCTION

Les changements profonds dans les modes de production agricole peuvent être à l'origine, du moins en partie, de nombreux problèmes qui se posent actuellement dans les agro-écosystèmes céréaliers tant en ce qui concerne la structure et la fertilité des sols, que l'état sanitaire des cultures.

Ainsi, depuis une dizaine d'années environ, une maladie fongique causée par *Drechslera teres* (Sacc.) Shoem. (= *Helminthosporium teres* Sacc.) anamorphe de *Pyrenophora teres* Drechs. a pris soudainement un caractère épidémique en France, en particulier dans les régions où l'orge est largement représentée. Ce pathogène se présente sous deux formes, *teres* et *maculata*, qui diffèrent par la morphologie des symptômes qu'ils induisent sur l'hôte (Barrault, 1989).

Un certain nombre de matières actives appliquées en végétation, possèdent un bon niveau d'efficacité à l'égard de la maladie à l'instar du propiconazole et du prochloraze (Metcalfe & Jones, 1985; Maufras & Chabanel, 1989). Cependant, la lutte chimique ne constitue pas une panacée

compte tenu des problèmes inhérents à l'environnement et à la possibilité d'apparition de pathotypes résistants aux fongicides. En Nouvelle-Zélande, Sheridan & Grbavac (1985) démontrent d'ailleurs la présence de souches de *D. teres* f. *teres* résistantes au triadiménol.

Dans un tel contexte, la lutte contre ce pathogène peut s'orienter vers le développement de microorganismes antagonistes capables d'inhiber ses différentes séquences biologiques (croissance, sporulation, conservation).

Les premiers travaux relatifs à cette thématique de recherche ont été menés dans notre laboratoire (Al-Ali et al., 1979). Ils s'inscrivent dans le cadre de la mise au point d'une méthode de lutte biologique fondée sur les antagonismes fongiques et/ou bactériens, nécessitant l'application d'une démarche méthodologique dont les étapes ont été définies par Sy et al. (1978). La première de ces étapes consiste à rechercher, isoler, et expérimenter *in vitro* des germes qui inhibent non seulement la croissance mycélienne du pathogène mais aussi la germination conidienne. Le travail de Al-Ali et al. (1979) ne constitue qu'une contribution à la première étape, il met cependant en exergue l'activité antagoniste de *Trichoderma harzianum* et d'un Actinomycète sur la croissance mycélienne de *D. teres* f. *maculata*.

Après un criblage permettant de dégager les antagonistes les plus performants, l'objet de ce travail est de compléter cette première phase de recherche en étudiant l'action des germes sélectionnés sur les deux séquences biologiques prédominantes du pathogène (croissance mycélienne et germination conidienne).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

MATÉRIEL BIOLOGIQUE

Le pathogène

Les souches monoconidiennes issues de la forme *teres* (R_1, R_3) et de la forme *maculata* (S_5, S_8) sont conservées sur des fragments de paille sous la forme de sclérotes, selon la méthode décrite par Barrault (1989).

Les antagonistes

A l'issue d'un screening préliminaire (souches isolées à partir de pailles d'orge et de terre humifiée), quatre champignons saprophytes (*Trichoderma* sp/BBL124, *Trichoderma viride*/NRG-1; *Trichoderma pseudokoningii*/N69; *Myrothecium verrucaria*/N76-1) et deux actinomycètes (N51 et N105) ont retenu notre attention en raison de leur activité antagoniste élevée.

MÉTHODOLOGIE

Confrontation directe pathogène-antagoniste.

Croissance mycélienne

Les inoculums du pathogène et de l'antagoniste constitués par des disques (diamètre = 4 mm) sont placés à 20 mm de distance l'un de l'autre, symétriquement par rapport au centre de la boite de Petri contenant 30 ml de milieu PCA (Pomme de terre 20g, carotte 20g, gélose 15g, eau distillée 1000 ml).

L'inhibition de la croissance mycélienne du pathogène (exprimée en surface) par les antagonistes est évaluée en pourcentage selon la méthode décrite

par Sy (1976). En ce qui concerne l'étude de l'influence de la température et du pH sur la confrontation pathogène-antagoniste, quatre températures (10, 18, 23 et 30°C) et cinq valeurs de pH (3,7; 5,1; 6,1; 7,3; et 8,3) ont été testées.

Germination conidienne

- Préparation de la suspension conidienne du pathogène

Les conidies du pathogène (R_3) sont issues d'une culture mise à incuber à 23°C (à l'obscurité, pendant 4 j sur un milieu PCA) puis transférées pendant 8 j à la lumière (héméropériode de 12 h/jour). La suspension condienne (dans de l'eau distillée stérile) est ajustée à une concentration égale à 10^5 conidies par ml.

- Préparation de la suspension des antagonistes

Chaque suspension conidienne issue d'un antagoniste fongique (10^6 conidies par ml) est réalisée à partir d'une culture âgée de 12 j.

Pour les actinomycètes, la suspension (composée d'environ 10^6 fragments mycéliens par ml) est obtenue à partir d'une culture âgée de 8 j sur un milieu liquide (V_8 à 5%, pH = 6), après broyage du mycélium dans de l'eau distillée stérile.

La confrontation directe est réalisée par l'adjonction à 0,1 ml de suspension d'antagoniste, de 0,1 ml de suspension sporale du pathogène dans la cupule d'une lame à concavité. Après 20 h d'incubation, en chambre humide, à 23°C, nous avons déterminé: le taux d'inhibition de la germination (I.G. %), l'indice théorique de colonisation (I.T.C.) et le taux de réduction de l'I.T.C. du pathogène, selon la méthode de Sy (1987).

- Confrontation indirecte pathogène-antagoniste

Les antagonistes sont cultivés en milieu liquide statique (V_8 à 5%) et les filtrats bruts recueillis après 7, 14, 21 et 30 jours sont stérilisés à froid sur une membrane "Millipore" (0,2μ).

Chaque filtrat est ensuite incorporé stérilement (après ajustement du pH à 6) dans le milieu de culture en surfusion du pathogène (P.C.A.), à raison de 25%. Le filtrat qui détermine, pour un antagoniste donné, l'inhibition maximale du parasite est considéré comme solution mère. Les dilutions successives de la solution mère de chaque antagoniste permettent d'établir une gamme de concentrations allant de 5 x 10^{-2} à 80 x 10^{-2} dans le milieu (V_8 à 5%, pH = 6) et de comparer l'efficacité des antagonistes (détermination de la concentration qui inhibe à 50% la croissance mycélienne et/ou la germination conidienne (C.I. 50)).

Dans tous les cas, les analyses statistiques sont effectuées après transformation en Arc sin $\sqrt{\%}$.

RÉSULTATS

Confrontation directe

- Croissance du pathogène

L'examen du Tableau I montre que *Trichoderma* sp/BRL124, *Trichoderma viride*/0NRG-1 et *Trichoderma pseudokoningii*/N69 présentent l'action antagoniste la plus nette à l'encontre des différentes souches de *D. teres* (inhibition comprise entre 74 et 92%) tandis que les actinomycètes et *Myrothecium verrucaria*/N76-1 sont les moins efficients (inhibition comprise entre 15 et 38%).

Tableau 1 - Action des antagonistes fongiques et bactériens sur *Drechslera teres* f. *teres* (R_1, R_3) et *D. teres* f. *maculata* (S_5, S_8). Is (%) = taux d'inhibition de la croissance mycélienne (exprimée en surface). Milieu P.C.A., pH = 6,1, t° = 23°C, obscurité, incubation = 6j. X, Y, correspondent aux pourcentages transformés Arc Sin $\sqrt{\%}$.

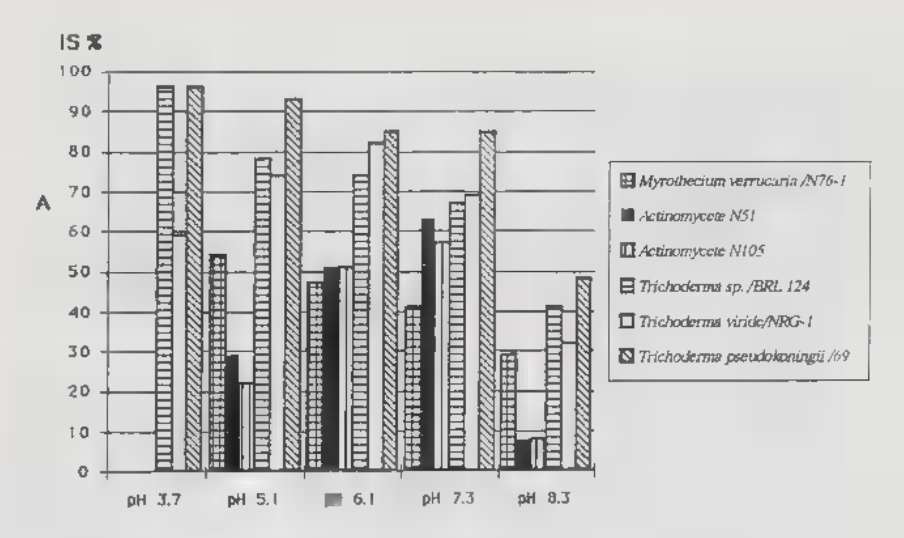
Table 1 - Action of fungal and bacterial antagonists on *D. teres* f. *teres* (R_1 and R_3) and *D. teres* f. *maculata* (S_5 and S_8): rate of inhibition (Is %) of the surface growth of the parasite colonies. (PCA medium, pH = 6.1, 23°C, incubation in the dark for 6 days). X, Y, percentage transformed using angular arcsine.

Antagonistes	Is (%) R1	R3	S5	S8	Moyenne %	Y
Trichoderma sp./BRL124	81	86	84	92	85,8	68,13[a]
Trichoderma viride/NRG-1	79	76	80	80	78,8	62,58[b]
Trichoderma pseudokoningii/N69	74	75	75	83	76,8	61,19[b]
Myrothecium verrucaria/N76-1	23	36	35	34	32	34,36[c]
Actinomycéte/N51	22	38	32	31	30,8	33,09[c]
Actinomycéte/N105	15	33	26	24	24,5	31,39[c]
Moyenne (%)	49	57,3	55,3	57,3	54,7	
X	45,39[b]	49,67[a]	48,58[a]	50,19[a]		

Les antagonistes les plus performants agissent essentiellement par contact avec enveloppement du parasite. En effet, dans cette situation, l'inhibition de la croissance du pathogène est d'autant plus élevée que la vitesse de croissance des antagonistes est grande. Les germes retenus semblent posséder un spectre d'action suffisamment large pour exercer leur pouvoir antagoniste à l'encontre des formes *teres* et *maculata* du pathogène.

L'examen de la Fig. 1A fait ressortir qu'à pH acide (3,7) *Trichoderma pseudokoningii*/N69 et *Trichoderma* sp/BRL124 inhibent à 100% la croissance du parasite. En revanche, cette valeur de pH, si elle permet à *Trichoderma viride*/NRG-1 d'inhiber à 60% la croissance du pathogène, est défavorable à l'expression antagoniste de *Myrothecium verrucaria* et des deux actinomycètes. L'efficacité maximale des actinomycètes est obtenue pour la valeur de pH égale à 7,3. *Trichoderma viride*/NRG-1 est le plus actif à pH 6,1 et *Myrothecium verrucaria* à 5,1.

La Fig. 1B montre que le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne du pathogène par un antagoniste varie en fonction de la température. L'efficience maximale des germes se manifeste à la température de 30°C, excepté pour *Trichoderma pseudokoningii*/N69 et *Trichoderma* sp/BRL124 pour lesquels les températures de 25°C et de 30°C déterminent un pourcentage d'inhibition non significativement différent. A température basse (10°C), si dans l'ensemble les antagonistes sont peu efficaces, on remarque cependant que *Trichoderma viride*/NRG-1 détermine une réduction de la croissance mycélienne de l'ordre de 60%.



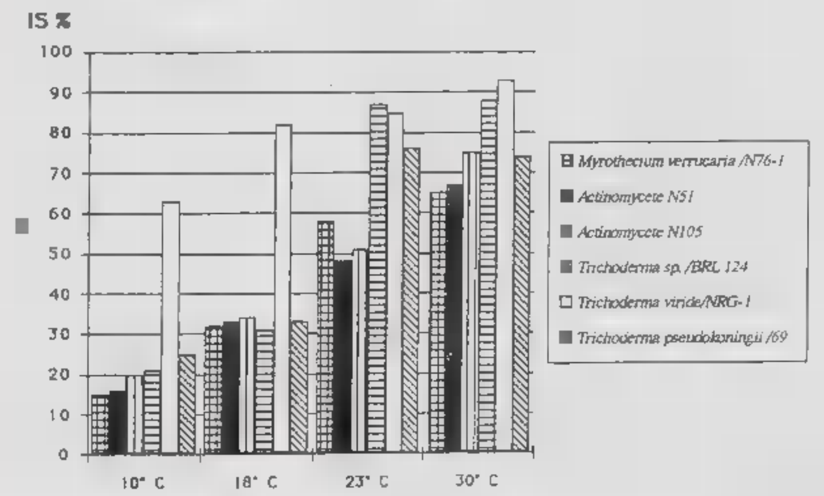


Fig. 1 - Pourcentage d'inhibition de la croissance (exprimée en surface) de *Drechslera teres* (R_3) par les antagonistes en fonction: A, du pH, B, de la température (Milieu P.C.A.; pH = 6,1; incubation = 5 j; obscurité).

Fig. 1 - Percentage of inhibition (Is) of the surface growth of *D. teres* (strain R_3) by various antagonists in relation to: A: pH; B: temperature (P.C.A. medium, incubation in the dark for 5 days).

Germination conidienne (Tabl. 2)

Les deux actinomycètes (N51 et N105) et *Myrothecium verrucaria* ont une remarquable action antagoniste sur cette séquence biologique puisque la germination des conidies est réduite à néant et que le taux de réduction de l'indice théorique de colonisation est donc de 100%.

Les autres germes, *Trichoderma* sp./BRL124, *Trichoderma pseudokoningii*/N69 et *Trichoderma viride*/NRG-1 entrainent une inhibition par-

tielle de la germination du parasite (respectivement de 88, 74 et 65%) avec également une inhibition corrélative (r = 0,98) de l'élongation du tube germinatif (46, 30 et 20%) et un taux de réduction de l'indice théorique de colonisation de 93,8, 81,9 et 72,3%.

Tableau 2 - Action de différents antagonistes sur la germination conidienne de *D. teres* (R_3) (incubation = 20 h, t° = 23°C). (1) I.G.% = taux d'inhibition de la germination conidienne. (2) I.T.% = taux d'inhibition de la croissance du tube germinatif. (3) L'indice théorique de colonisation (I.T.C.) exprimé par rapport au témoin est le produit du taux de germination et de la longueur moyenne du tube germinatif de *D. teres* en présence de l'antagoniste considéré. (4) T.R.I.C.T. = taux de réduction de l'indice théorique de colonisation.

Table 2 - Action of various antagonists on the conidial germination of *D. teres* (R_3) (incubation at 23°C for 20 h). (1) I.G.% = conidial germination inhibition rate. (2) I.T.% = germinative tube growth inhibition rate. (3) Theoretical colonization index (I.T.C.) expressed with respect of the control, it is the product of the average germination rate and of the average length of the germinative tube of *D. teres* in the presence of the antagonist. (4) T.R.I.C.T. = The rate of decrease in the theoretical colonization index.

Antagonistes	I.G. (%) (1)	I.T. (%) (2)	I.T.C. (3)	T.R.I.C.T. (4)
Témoin	-	-	3800	-
Actinomycète/N51	100	100	0	100
Actinomycète/N105	100	100	0	100
Trichoderma viride/NRG-1	65	20	1050	72,3
Myrothecium verrucaria/N76-1	100	100	0	100
Trichoderma pseudokoningii/N69	74	30	696,6	81,9
Trichoderma sp./BRL124	88	48	237,12	93,8

Confrontation indirecte (Tabl. 3)

Les activités antifongiques des filtrats de culture de *Myrothecium verrucaria* et de l'actinomycète N51 sur la croissance de *D. teres* se révèlent être les meilleures (C.I. 50 respectivement égale à 12 x 10^{-2} et 14 x 10^{-2}). Les filtrats de *Trichoderma pseudokoningii*/N69 et de *Trichoderma* sp./BRL124 ont une efficacité moyenne (5,2 x 10^{-3} et 4,6 x 10^{-3}); enfin ceux issus de *Trichoderma viride*/NRG-1 sont les moins efficients.

DISCUSSION

Cette étude *in vitro* montre l'efficacité d'un certain nombre d'antagonistes fongiques et bactériens sur deux séquences biologiques essentielles du pathogène, à savoir, la croissance mycélienne et la germination conidienne.

Sur la croissance mycélienne, dans les conditions optimales de développement du parasite, les antagonistes les plus performants sont des microorganismes dont l'action est essentiellement d'ordre physique, par contact, avec enveloppement du pathogène. L'inhibition de la croissance du parasite est corrélée positivement avec la vitesse de croissance des germes antagonistes appartenant au genre *Trichoderma*. Parmi ceux-ci, on trouve *Trichoderma viride* /NRG-1 qui a déjà montré sa capacité à inhiber la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* (Norng, 1979). En réalité, il semble que ces antagonistes agissent également par émission de substances antifongiques si l'on en juge par les résultats de la confrontation indirecte montrant que le filtrat de culture est sus-

Tableau 3 - Taux d'inhibition de la croissance de *D. teres* (R_3) en fonction de plusieurs concentrations de filtrats d'antagonistes fongiques et bactériens. Détermination de la C.I.50. (Milieu V_8 à 5%, gélose, t° = 23°C, obscurité, durée d'incubation 6 jours, pH = 6).

Table 3 - Percentage of inhibition of the growth surface of *D. teres* by various filtrates concentrations of fungal and bacterial antagonists of *D. teres*. Determination of C.I.50. (Solid V_8 5% medium, t° = 23°C, pH = 6, incubation in dark for 6 days).

Antagonistes	Concentration des filtrats	% d'inhibition de la croissance	C.I. 50
M. verrucaria/N76-1	5×10^{-2} 10×10^{-2} 30×10^{-2} 50×10^{-2}	21 49 83 100	12×10^{-2}
Actinomycète /N51	5×10^{-2} 10×10^{-2} 30×10^{-2} 50×10^{-2}	17 45 75 95	14×10^{-2}
Trichoderma sp./BRI.124	10×10^{-2} 30×10^{-2} 50×10^{-2} 80×10^{-2}	10 18 47 75	46×10^{-2}
T. pseudokoningii/N69	10×10^{-2} 30×10^{-2} 50×10^{-2} 80×10^{-2}	14 35 52 82	52×10^{-2}
Trichoderma viride/NRG-1	10×10^{-2} 30×10^{-2} 50×10^{-2} 80×10^{-2}	14 12 32 65	70×10^{-2}

ceptible d'inhiber de maniée tangible la croissance du pathogène. Cependant, cette activité antifongique est loin d'être comparable à celle extériorisée par *Myrothecium verrucaria* et les actinomycètes N51 et N105. L'efficience des microorganismes sus-nommés est liée exclusivement à la biosynthèse de substances télétoxiques qui perturbent la croissance du pathogène. Cette inhibition du développement se matérialise par la présence de morphoses mycéliennes (filaments hypertrophiés généralement hyperseptés et hyperramifiés). Ce phénomène est décrit par Al-Ali et al. (1979) lors de la confrontation entre *D. teres* f. *maculata* et un actinomycète (N19) et par Norng (1979) dans le binôme *Botrytis cinerea-Myrothecium verrucaria*.

Le pouvoir antagoniste des germes sélectionnés (qu'ils agissent à distance ou par contact) semble suffisamment polyvalent pour s'exercer sur les deux formes du pathogène. Ce résultat, s'il se confirme sur un grand nombre de souches issues de la f. *teres* et de la f. *maculata* est loin d'être négligeable compte-tenu que l'étude de l'action de certains fongicides sur la croissance et la germination de *D. teres* montre une sensibilité amoindrie de la f. *maculata* (non publié).

L'inhibition de la croissance mycélienne d'un pathogène *in vitro* par des antagonistes apparaît nettement dépendante non seulement de la température

mais également du pH (Norng, 1979; Van Den Boogert & Jager, 1984; Sy, 1987). En ce qui concerne la température, l'efficience maximale des antagonistes s'exerce ici aux températures optimales et supra-optimales de *D. teres* (25° et 30°C).

Cette efficacité est liée au thermopréférendum de ces antagonistes (Mostafa, 1982). Cependant *Trichoderma viride*/NRG-1 à une température de 10°C supraminimale pour le pathogène (Barrault, 1989), a un pouvoir antagoniste non négligeable. Dans la mesure où cette température est fréquente (en hiver au cours de la journée ou même au printemps et en automne durant la nuit) il est parfaitement convenable de considérer que cet antagoniste implanté à la surface des pailles puisse juguler la croissance du parasite et donc diminuer l'importance de l'inoculum primaire.

Outre la température dont nous venons de souligner le rôle dans l'expression finale de l'antagonisme, le facteur pH exerce également une influence non négligeable au cours des interactions antagonistes x parasites, *in vitro*. L'efficience remarquable de *Trichoderma pseudokoningii*/N69 et de *Trichoderma* sp./BRL124, à pH 3,7 s'explique par l'interaction de deux facteurs:

• une croissance optimale de ces antagonistes à pH très acide (Mostafa, 1982),

• un faible développement de *D. teres* à ce pH, l'optimum étant de 5 à 6 (Barrault, 1989). Nous retrouvons dans cette confrontation avec *D. teres* le caractère de l'activité des antagonistes fongiques efficaces à l'égard de *Pyricularia oryzae* (Sy, 1987) ou de *Helminthosporium turcicum* (Mickala-Doukaga et al., 1978) à savoir que les antagonistes s'expriment d'autant mieux qu'ils trouvent des conditions de pH favorables à leur croissance.

L'activité des autres antagonistes fongiques, à l'instar de *Trichoderma viride*/NRG-1 et de *Myrothecium verrucaria* est maximale également pour des pH acides (cependant plus élevés que précédemment). Cependant la corrélation existant entre la vitesse de croissance de l'antagoniste et l'activité antagoniste n'est pas toujours vérifiée dans la mesure où l'inhibition du pathogène est liée à l'existence de métabolites dont la production n'est pas nécessairement corrélée positivement avec la croissance (ex: *Myrothecium verrucaria*).

Les deux actinomycètes antagonistes qui s'expriment par l'émission de composés antibiotiques sont les plus efficients à un pH basique (ou voisin de la neutralité). Ce sont des conditions généralement favorables à la croissance et à la biosynthèse des métabolites chez les bactéries.

Le blocage du développement du parasite peut être occasionné par une inhibition affectant soir l'émission et/ou l'élongation du tube germinatif, soit la différenciation de l'appressorium. Nos résultats montrent la remarquable efficacité des actinomycètes et de *Myrothecium verrucaria* sur cette séquence biologique, puisqu'ils réduisent à néant l'émission du tube germinatif. D'ores et déjà on peut entrevoir leur utilisation dans le cadre d'une lutte préventive dans la mesure où leur innocuité à l'égard de l'hôte aura été prouvée.

Le présent travail ne constitue qu'une première étape dans la mise au point d'une méthode de lutte biologique. Nous serons amenés à poursuivre notre expérimentation *in vitro* en étudiant l'action des antagonistes sur d'autres séquences biologiques du pathogène à l'instar de la conservation qui est polymorphe ("resting mycelium", chlamydospores, périthèces, sclérotes).

RÉFÉRENCES

AL-ALI B., BARRAULT G. et ALBERTINI L., 1979 - Action *in vitro* d'antagonistes fongiques et bactériens sur la croissance mycélienne de l'*Helminthosporium teres* parasite de l'orge. *Bull. Soc. Mycol. France* 95: 279-295.

BARRAULT G., 1989 - L'helminthosporiose de l'orge causée par *Drechslera teres*. Thèse Doctorat d'Etat, INP Toulouse.

MAUFRAS J.Y. et CHABANEL Y., 1989 - Les maladies des orges. *Perspectives Agricoles* 142: 66.

METCALFE N.D.S. and JONES D.G., 1985 - Evaluation of fungicides for control of net blotch of winter barley. *Ann. Appl. Biol.* 106: 42-43.

MICKALA-DOUKAGA E., ALBERTINI L. et PETITPREZ M., 1978 - Action *in vitro* d'antagonistes fongiques sur la croissance mycélienne de l'*Helminthosporium turcicum* Pass., parasite du maïs. *Bull. Soc. Mycol. France* 94: 33-47.

MOSTAFA M., 1982 - Recherches sur la lutte biologique contre l'*Helminthosporium teres*, parasite de l'orge, par l'utilisation de microorganismes antagonistes et d'une souche hypoagressive. Thèse Docteur-Ingénieur, n° 220, INP Toulouse.

NORNG K., 1979 - Recherches sur la lutte biologique contre le *Botrytis cinerea* Pers., parasite de la vigne par utilisation d'antagonistes fongiques. Thèse Docteur-Ingénieur, n° 72, INP Toulouse.

SHERIDAN J.E. and GRBAVAC N., 1985 - Cultivar differences in response to triadimenol seed treatment for control of barley net blotch caused by *Pyrenophora teres*. *Pl. Dis.* 69: 77-80.

SY A.A., ALBERTINI L. et HAMANT C., 1978 - Recherches sur la lutte biologique contre *Pyricularia oryzae*. Action *in vitro* d'antagonistes fongiques sur la germination des conidies du parasite. *Rev. Gén. Bot.* 85: 63-81.

SY A.A., 1987 - Lutte biologique contre la pyriculariose du riz (*Pyricularia oryzae*). Stratégie et applications. Thèse Doctorat d'Etat, n° 120, INP Toulouse.

VAN DEN BOOGERT P.H. and JAGER G., 1984 - Biological control of *Rhizoctonia solani* on potatoes by antagonists. Inoculation of seed potatoes with different fungi. *Netherlands J. Pl. Pathol.* 90: 117-126.

